

Aus dem Institut für Virologie der Universität Zürich
(Direktor: Prof. Dr. R. Wyler)

KLASSIFIZIERUNG
DER PARAPOXVIREN (STOMATITIS-, ORF- UND EUTERPOCKEN-VIREN)
MIT HILFE DER
RESTRIKTIONSANALYSE

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Veterinär-Medizinischen Fakultät
der Universität Zürich

vorgelegt von
Kurt Raymann
Tierarzt
von St. Gallenkappel

Genehmigt auf Antrag von
Prof. Dr. R. Wyler, Referent
Prof. Dr. Dr. h.c. A. Mayr, Korreferent

Rieker + Amman AG Druck, Glatthbrugg
Zürich 1980

1981

Aus dem Institut für Virologie der Universität Zürich
(Direktor: Prof. Dr. R. Wyler)

KLASSIFIZIERUNG
DER PARAPOXVIREN (STOMATITIS-, ORF- UND EUTERPOCKEN-VIREN)
MIT HILFE DER
RESTRIKTIONSANALYSE

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Veterinär-Medizinischen Fakultät
der Universität Zürich

vorgelegt von
Kurt Raymann
Tierarzt
von St. Gallenkappel

Genehmigt auf Antrag von
Prof. Dr. R. Wyler, Referent
Prof. Dr. Dr. h.c. A. Mayr, Korreferent

Rieker + Amman AG Druck, Glattbrugg
Zürich 1980



ABKUERZUNGEN

AK	Antikörper
ATCC	American Type Culture Collection
BSA	Bovines Serum Albumin
D	Dalton
DNA	Desoxyribonukleinsäure (acid)
EP	Euterpocken
EDTA	Aethylendiamintetraazetat
FCS	Foetales Kälberserum (calf)
KV	Kilovolt
MEM	Minimum Essential Medium
MG	Molekulargewicht
MK	Melkerknoten
NatCA	Neutrales Trichlorazetat
Orf	Ecthyma contagiosum, Lippengrind
PBS-H	Phosphate buffered saline, pH 7,2, ohne Ca^{++} und Mg^{++}
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SP	Stomatitis papulosa
UV	Ultraviolett
V	Volt
ZPE	Zytopathischer Effekt

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. EINLEITUNG	1
1.1. Eigenschaften der Parapoxviren	1
1.2. Versuche zur Klassifizierung der Parapoxviren	2
2. PROBLEMSTELLUNG DER ARBEIT	8
3. MATERIAL UND METHODEN	9
3.1. Parapoxvirusstämme	9
3.2. Zellkulturen	10
3.3. Virusvermehrung	10
3.4. Virusreinigung	11
3.5. DNA-Extraktion	12
3.6. Restriktion	12
3.7. Agarose - Gelelektrophorese	13
3.8. Elektronenmikroskopische DNA-Längenmessung	13
4. RESULTATE	15
4.1. Restriktionsanalyse	15
4.1.1. Eco RI-Restriktionsmuster	15
4.1.2. Hind III-Restriktionsmuster	18
4.1.3. Bst E II-Restriktionsmuster	18
4.2. MG-Bestimmung durch Summation der MG der Fragmente nach Gelelektrophorese	21
4.3. MG-Bestimmung durch DNA-Längenmessung im Elektronenmikroskop	25
5. DISKUSSION	29
6. ZUSAMMENFASSUNG	35
7. LITERATURVERZEICHNIS	36

1. EINLEITUNG

1.1. Eigenschaften der Parapoxviren

Die Viren der Stomatitis papulosa (SP), der Euterpocken (EP), des Orfs (auch Ecthyma contagiosum, Dermatitis pustulosa oder Lippengrind genannt) und des Melkerknotens (MK) werden dem Genus Parapoxvirus der Familie der Poxviridae zugeordnet. Der Name Parapoxvirus (früher Paravakzinevirus) geht auf Clemens Johann v. Pirquet zurück, der 1916 auf der Haut von Patienten, die er mit vom Rind gewonnener Pockenlymphe vakziniert hat, gelegentlich eine eigentümliche knotenförmige Reaktion beobachtete, die er als "Paravakzine" bezeichnete (18). Schon 1892 wurde dieselbe Hautveränderung von Danvé und Larue unter dem Namen "Vaccine rouge" beschrieben. Diese iatrogene Impfreaktion dürfte mit dem Melkerknoten identisch sein und sich nur durch die Lokalisation von diesem unterscheiden.

Die Parapoxviren weisen gemeinsame physikalisch-chemische und biologische Merkmale auf, und bilden deshalb ein Genus innerhalb der Familie Poxviridae (23). Sie besitzen eine kokonartige Gestalt mit spiralig aufgewundenen Proteinfäden, sind 300 x 170 nm gross und somit signifikant kleiner als die Orthopoxviren (350 x 260 nm). Es bestehen keinerlei immunologische Beziehungen zu anderen Viren, insbesondere nicht zu denjenigen der Variola-Vakzinia Gruppe (19).

Parapoxviren sind zudem weder auf das bebrütete Hühnerei, noch auf kleine Labortiere übertragbar und hinterlassen nach der Infektion bei Mensch und Tier (Schaf/Rind) keine AK, die für eine serologische Typisierung der Viren dienen könnten (18, 19).

1.2. Versuche zur Klassifizierung der Parapoxviren

Schon in den späten fünfziger- und dann in den sechziger-Jahren wurde versucht, auf immunologischer Basis eine Klassifizierung der Parapoxviren vorzunehmen. Wie erwähnt, eignet sich aber der Neutralisationstest für die Sero-typisierung nur bedingt. Liebermann (19) bediente sich deshalb des fluoreszenzserologischen Nachweises von Parapoxvirusantigenen in infizierten Zellkulturen. Er untersuchte 4 EP-, 3 MK, 3 Orf- und über 20 SP-virusstämme und stellte Hyperimmunseren durch wiederholte intravenöse, subkutane und intramuskuläre Injektionen von hochtitrigem Zellkultur-virus an Kälbern her. Mit Fluoreszein markierten SP- und Orf-Hyperimmunseren konnte er sowohl in mit SP- und Orf-Virus als auch in mit EP- und MK-Virus infizierten Kälber-nieren- und Kälberhodenzellkulturen spezifisch fluores-zierende Strukturen nachweisen. Die Fluoreszenz konzentrierte sich besonders auf die auch lichtmikroskopisch nachweisbaren zytoplasmatischen Einschlusskörper (35).

Aus den fluoreszenzserologischen Untersuchungen zog Liebermann den Schluss, dass die Viren der SP, des Orfs, der EP und des MK serologisch eng miteinander verwandt sein müssen, wobei er die Identität einzelner dieser Virusstämme nicht ausschliessen konnte. Mit der Immunofluoreszenz ist zwar eine klare Abgrenzung der Parapoxviren gegenüber anderen Viren möglich. Sie erlaubt jedoch keine Klassierung innerhalb des Genus Parapoxvirus.

1968 führte Nagington (3) ausgedehnte Versuche durch, um anhand des Wachstums der Viren, des zytopathischen Effekts und der histologischen Veränderungen in den infizierten Zellen, die Parapoxviren zu klassifizieren. Er stellte dabei fest, dass Orf-Viren in den ersten Passagen nur auf Schaf-zellen wachsen, dass aber Orf-Viren, die von einer Infektion beim Menschen stammten, diese Spezifität nicht mehr zeigten.



Abb. 1 Elektronenmikroskopische Aufnahme
eines negativ-kontrastierten Parapoxvirus
(Stamm EP P 4/4).



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Das SP-Virus, das EP-Virus und das MK-Virus unterschieden sich bezüglich Wachstum auf verschiedenen Zellarten (Hodenzellen vom Rind und vom Schaf und menschliche Amnionzellen) nicht. Das Orf-Virus, unabhängig ob es vom Mensch oder Schaf isoliert wurde, konnte er aufgrund der unterschiedlichen Ausbildung des zytopathischen Effekts von SP, EP und MK-Viren differenzieren (erstere bilden einen "offenen" ZPE, letztere einen "geschlossenen"). Auch bei histologischer Untersuchung infizierter Zellen gelang ihm, wie bereits von Plowright und Ferris (34) beschrieben, das Orf-Virus von den anderen Parapoxviren abzutrennen. Nagington kam zum Schluss, dass Parapoxvirusstämme vom Rind unter sich eine eng verwandte Gruppe bilden, ebenso wie diejenigen vom Schafe; er schlug auf dieser Grundlage eine Einteilung der Viren nach dem Wirt und nach der Krankheit, die sie erzeugen, vor (Herkunft und Krankheitsbild).

Pospischil und Bachmann (36) beobachteten elektronenoptisch bei natürlicher Infektion von Rindern mit dem SP-Virus tubuläre Strukturen mit einer Doppelmembran im Zellkern. Bei natürlicher Infektion von Schafen fanden sie dagegen stets filamentöse Veränderungen. Diese Veränderungen konnten auch in vitro reproduziert werden. So induzierten SP-Viren in Kulturen von bovinen und ovinen, embryonalen Lungenzellen wohl tubuläre Strukturen. Aber nach Infektion mit Orf-Viren fanden sich in ovinen Zellen zum Teil auch tubuläre (SP-ähnliche) Strukturen .

Die oben beschriebenen Ansätze für eine Differenzierung der Parapoxviren sind aber nur bedingt brauchbar, wie verschiedene Uebertragungsversuche zeigten. So gelang schon 1923 Aynaud (2) die erfolgreiche Uebertragung von Orf-Viren auf das Kalb. Huck (13), Nagington (32), und Lauder et al. (17) berichteten über die Uebertragung von EP-Viren

auf Kälber, bei welchen dann aber typische SP-Veränderungen zu finden waren. Ebenso zeigten mit EP-Viren infizierte Schafe typische Orf-Symptome.

Weitere Klassifizierungsversuche unternahmen Wittek et al. (43) mit einer Analyse der Neutralisationskinetik, wie sie Mc Bride (25) mit Polioviren durchgeführt hat. Eine Klassifizierung der untersuchten Stämme war jedoch auch mit dieser Methode nicht möglich. Einige SP-virusstämme schienen eine engere Verwandtschaft mit Orf-virusstämmen aufzuweisen als mit anderen SP-virusstämmen. Demnach sollten Orf-virusstämme und SP-virusstämme gemeinsame antigene Determinanten besitzen.

Neuerdings wird die Restriktionsanalyse zur Klassifizierung von Viren herangezogen. 1978 haben Müller et al. (28), Esposito et al (6) sowie 1979 Mackett u. Archard (22) mit dieser Methode die genetische Verwandtschaft unter Orthopoxviren abgeklärt. Sie verdauten DNA der verschiedenen Virusstämme mit bestimmten Restriktionsendonukleasen, trennten die DNA-Fragmente elektrophoretisch auf und verglichen die Bandenmuster.

Wittek et al. (43)versuchten mit Hilfe der Restriktionsanalyse auch eine Gruppierung innerhalb des Genus Parapoxvirus vorzunehmen. Es wurden 4 SP- und 3 Orf-virusstämme untersucht. Die DNA wurde mit den Restriktionsendonukleasen Eco RI, Hind III, Sal I, Kpn I und Xho I verdaut. Die Parapoxvirus-DNA's zeigten nun aber im Unterschied zu den Orthopoxvirus-DNA's heterogene Restriktionsmuster.

Während bei den Orthopoxviren ein bestimmtes Bandenmuster bei allen Stämmen zu finden war, gleichgültig von welcher Tierart sie stammten, und in welcher Zellart sie vermehrt wurden (konservative Region in der Mitte des Genoms (1,41)), konnten regelmässig auftretende Bandenmuster bei den

verschiedenen untersuchten Parapoxviren nicht beobachtet werden. Trotz der Heterogenität der Restriktionsmuster wurden von Wittek et al. die SP-virusstämme in zwei Gruppen, die Orf-virusstämme in eine dritte, allerdings unter sich heterogene Gruppe, eingeteilt.

2. PROBLEMSTELLUNG DER ARBEIT

Die Klassifizierung von Stämmen innerhalb des Genus Parapoxvirus mit Hilfe verschiedener biologischer und immunologischer Methoden blieb bis heute kontrovers.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand darin, mit Hilfe der Restriktionsanalyse die genetische Verwandtschaft von Parapoxviren untereinander anhand einer grösseren Zahl von Virusstämmen zu untersuchen, basierend auf den Ergebnissen von Wittek et al. (43) mit SP- und Orf-Viren.

Dabei sollten folgende Kriterien berücksichtigt werden:

1. Vergleich der Restriktionsmuster der DNA
2. Bestimmung des Molekulargewichts der DNA durch Summation der Molekulargewichte der einzelnen Banden im Gel
3. Bestimmung des Molekulargewichts durch Ausmessen des DNA-Stranges im Elektronenmikroskop

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1. Parapoxvirus - Stämme

In dieser Arbeit wurden 12 Stomatitis papulosa-, 4 Orf- und 4 Euterpocken-Virusstämme untersucht:

Tabelle 1

a) Stomatitis papulosa - Virusstämme:		
Bezeichnung	Herkunft	
V 660	Prof. A. Mayr, München	
R 406	Prof. Steck, Bern	
R 1781		
R 1374		
R 2015		
69558	Dr. P. R. Rondhuis, Rotterdam	
69559		
VR 801	ATCC, Rockville, Maryland	
66/1456	Dr. C. Castrucci, Perugia	
Ch 14/B	Prof. v. Bekkum, Lelystad, Holland	
M 20/4	Staatl. Veterinärprüfanstalt, Berlin, DDR	
M 7/4		
b) Orf- (Lippengrind-, Ecthyma contagiosum-) Virusstämme:		
60898	Veterinaria AG, Zürich	Impfstämme
Souche 2	IFFA, Mérieux, Lyon	
Ch 32/H	Prof. van Bekkum, Lelystad, Holland	
XIVa	Dr. Pilaski, Düsseldorf	
c) Euterpocken:		
VR 634	ATCC, Rockville, Maryland	
174/77	Dr. A. Metzler, Zürich	
P 4/4	Staatl. Veterinärprüfanstalt Berlin, DDR	
70448	Dr. P. R. Rondhuis, Rotterdam	

3.2. Zellkulturen

Nasenmuschelepithelzellen von ca. 5 Monate alten Rinderfoeten dienten als Zellkultur. Die herauspräparierten Epithelien wurden 2x in PBS-A gewaschen, dann mit der Schere zerkleinert und 45 Minuten bei 35°C trypsiniert (Trypsin 0.125%). Anschliessend wurde die Zellsuspension filtriert und das Filtrat bei 800 g 10 Min. zentrifugiert. Das Zellsediment resuspendierte man in Eagle's MEM (Gibco, Glasgow, Schottland), das 10% FCS (Nabi, Florida, USA) und 10⁵E Penicillin und 100 µg Streptomycin/l (beide von Novo Industri A/S Kopenhagen, Dänemark) enthielt, und säten es in Zellkulturflaschen (Corning, von Corning Glassworks, New York, USA) aus. Nach 24 h Bebrütung bei 37°C erfolgte jeweils ein Mediumwechsel, dann belassen wir die Zellen bei 37°C bis sie zu einem Monolayer ausgewachsen waren. Bei Bedarf wurde der ausgewachsene Monolayer subkultiviert.

3.3. Virusvermehrung

In der Anfangsphase wurde mit einer Multiplizität von 0.01 infiziert, bis der Virusstamm an das Zellsystem adaptiert war. Für die Endvermehrung wurden pro Virusstamm 6 - 8 Rollerflaschen (Corning, 490 cm²) mit einer Multiplizität von 0.1 - 1 infiziert. Nach einer Adsorptionszeit von 90 Min. bei 35°C wurden die nicht adsorbierten Viren abgesogen und je Rollerflasche 40 ml Eagle's MEM mit 2% FCS zugegeben. Nach 4 - 6 Tagen Inkubation bei 35°C auf dem Rollerapparat (Bio-Cult, Tecnomara, Zürich) bei 8 1/2 Umdrehungen/Stunde, zeigten die infizierten Monolayer 80 - 90% ZPE und wurden zusammen mit dem Medium eingefroren.

3.4. Virusreinigung

Das gesamte Virusmaterial (Zellen und Medium) wurde bei 25000 g in einer Sorvall RC2-B Zentrifuge mit dem GSA-Rotor 2 Stunden pelletiert. Der Ueberstand, der weniger als 1^o/oo Virusmaterial enthielt, wurde verworfen und das Sediment in 10 - 20 Volumen Puffer Lösung, enthaltend 10 mM Tris-HCl, pH 9, 1 mM EDTA, aufgenommen. Dieses Material wurde nun mit dem Dounce-Homogenisator behandelt (10 - 15 Stösse) und die homogene Virussuspension anschliessend bei 1000 g in einem HP-4-Ausschwingrotor (Sorvall) 10 Minuten zentrifugiert (Low speed). Der Ueberstand wurde anschliessend eisgekühlt, das Pellet nochmals in 10 mM Tris-HCl, pH 9, 1 mM EDTA resuspendiert, homogenisiert und bei 1000 g 10 Minuten zentrifugiert. Nach Verwerfen des Sediments wurde das gepoolte Virusmaterial in einem SS-34 Winkelrotor (Sorvall) bei 48000 g 40 Minuten sedimentiert. Der Ueberstand wurde verworfen, das Pellet in 1 mM Tris-HCl, pH 9, 1 mM EDTA resuspendiert und 10 Minuten bei 37^oC mit Trypsin (20 µg/ml) behandelt und anschliessend damit ein kontinuierlicher 25% - 40% Sucrose-Gradient überschichtet. Nach 30 Minuten Zentrifugation bei 23000 rpm (Beckmann L2-65B-Ultrazentrifuge, SW-27-Rotor) bildete das Virus eine Bande in der Mitte des Gradienten und wurde von oben mittels einer Kappillare abgesogen. Das Sediment resuspendierte man in Puffer (1 mM Tris-HCl, pH 9, 1 mM EDTA) und überschichtete damit erneut einen 25% - 40% Sucrose-gradienten. Die gepoolten und mit 1 mM Tris-HCl, pH 9, 1 mM EDTA verdünnten Virusbanden wurden bei 48000 g im SS-34 Winkelrotor (Sorvall) 40 Minuten pelletiert. Nach Verwerfen des Ueberstandes wurde das gereinigte Virus in einem definierten Volumen Pufferlösung (50 mM Tris-HCl, pH 7.8, 1 mM EDTA) aufgenommen (meist in 1 ml).

3.5. DNA - Extraktion

Der Virussuspension wurden 27% Sucrose und 0.5% SDS zugegeben. Darauf wurde mit 20 µg Proteinase K (Böhringer, Mannheim, BRD) pro 1 OD (optische Dichte) (260 nm) gereinigte Virussuspension 10 Minuten bei 37°C inkubiert (14) und 1/10 Volumen 2 M NaTCA (1 M NaOH, 1 M TCA, pH 7,5) zugegeben. Dann folgte die erste Extraktion mit 2 Volumen Phenol-Chloroform (1:1, v/v, H₂O gesättigt) während 15 h und eine 2. Extraktion während 4 h, an welche sich eine Extraktion mit 2 Volumen Chloroform-Isoamylalkohol (24:1, v/v), 2 h, anschloss, wobei die Proben jeweils bei 4°C auf einem Drehteller im Winkel von 45° mit 16 Umdrehungen/Min. durchmischt wurden. Die DNA-haltige wässrige Phase und die Phenol- bzw. Chloroformphase wurden durch Zentrifugation während 10 Min. bei 1500 g getrennt. Dann wurde die gelöste DNA mit 1/10 Volumen 5 M Ammoniumacetat und 3 Volumen absoluten Aethanol 15 h bei -20°C praezipitiert und anschliessend mit dem HP-4 Ausschwingrotor (Sorvall) bei 16000 g 30 Min. pelletiert. Der absolute Aethanol wurde durch 80% Aethanol ersetzt, die Proben nochmals bei 16000 g 30 Min. zentrifugiert, anschliessend nach Verwerfen des 80% Aethanol die DNA im Exsikkator getrocknet und in 100 µl Puffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.8, 1 mM EDTA) gelöst.

3.6. Restriktion

Die DNA wurde mit den Endonukleasen Hind III (Biolabs, New England, Beverly, Mass.), Eco RI und Bst E II (beide Böhringer, Mannheim, BRD) verdaut. Für den Inkubationsansatz wurden die von den Enzymlieferanten vorgeschlagenen Pufferlösungen verwendet, zusätzlich wurde noch BSA bis zu einer Konzentration von 10 ng/µl zugegeben. Die Inkubationszeiten betragen für Hind III und Eco RI 3 1/2 h bei 37°C

und für Bst E II 2 h bei 37°C. Die Enzymwirkung wurde durch Erwärmen auf 65°C während 10 Min. gestoppt.

3.7. Agarose - Gelelektrophorese

Die Elektrophorese wurde nach den Angaben von Wittek et al. (40, 41) durchgeführt.

Nach der Zugabe von 1/2 Volumen "Agarosesuspension" wurden die Proben auf ein Agarose-Flachgel (17x17x0.5 cm) geladen. Die "Agarosesuspension" bestand aus 0.2% Agarose gelöst in 20 mM Na-EDTA (ph 7.5), 10 mM Tris-HCl (ph 7.8), 10% Glycerol und 0.01% Bromphenolblau. Die Agarosekonzentration betrug für Hind III und Eco RI 0.6%, für Bst E II 0.9%. Als Elektrophoresepuffer wurde eine Tris-phosphat-Lösung verwendet (36 mM Tris-HCl, 30 mM Na H₂PO₄, 1 mM Na₂ EDTA, ph 7.8). In allen Experimenten liessen wir die Proben 30 Min. bei 10 V in die Agarose einlaufen. Die eigentliche Elektrophorese dauerte für Hind III- und Eco RI-Proben 16 1/4 h bei 35 V, für Bst E II-Proben 15 h bei 30 V. Dann wurde das Agarosegel im Elektrophorese-Puffer, der 1 µg/ml Ethidiumbromid enthielt, 30 Min. gefärbt, kurz gewaschen und unter einer UV Lampe (254 nm Wellenlänge) durch einen Rotfilter photographiert (Ilford HP-4 Planfilm, 10.2 x 12.7 cm).

3.8. Elektronenoptische DNA - Längenmessung

Die gereinigte DNA wurde nach der Methode von Kleinschmidt et al. (15) und nach der wässrigen Methode von Davis et al. (4) gespreitet. Die so präparierte DNA wurde auf Kollodium bedeckte Netzchen "aufgepickt", mit Uranylacetat kontrastiert, in Alkohol gewaschen und getrocknet. Anschliessend folgte unter Rotation der Netzchen die Beschattung mit Platin-Kohle. Die gespreiteten DNA-Moleküle wurden in

einem Philips-201 Elektronen-Mikroskop (EM) bei 40 KV photographiert. Mit einem MOP AMO 2 (Manual Optical Picture Analyzer) wurde die Länge der DNA-Moleküle gemessen. Einerseits wurde als Vergrößerungsvergleich eine Marker DNA (zirkuläre Form der PM₂-Virus-DNA, 3.4 µm) mitgespreitet und dann mitgemessen, andererseits wurde die effektive Vergrößerung im EM mit Hilfe einer Grating-Replica (Kreuzgitter; Gitterabstand 0.463 µm) bestimmt.

4. RESULTATE

4.1. Restriktionsanalyse

Die DNA von 12 SP-, 4 Orf- und 4 EP-Virusstämmen wurde mit den Endonucleasen Eco RI, Hind III und Bst E II verdaut und in 0.6% bzw. 0.9% Agarose-Flachgelen (17x17x0.5 cm) elektrophoretisch aufgetrennt (Abb. 2,3 und 4). Die kleinen, auf der Kopie schlecht sichtbaren Fragmente, wurden mit einem Pfeil markiert.

4.1.1. Eco RI-Restriktionsmuster (Abb. 2)

Eco RI (Erkennungssequenz: G'AATTC) schnitt die Parapox-virus-DNA in 4 bis 7 Fragmente, wobei das MG des grössten Fragments 44×10^6 D (EP VR 634/Bahn 18) und das MG des kleinsten Fragments 2.2×10^6 D (Orf XIVa/Bahn 17) betrug. Die Restriktionsmuster von SP V 660 (Bahn 1), SP R 406 (Bahn 2) und SP 801 (Bahn 3) sind untereinander sehr ähnlich, bei allen sind Fragmente mit einem MG von 14, 10 und 3.5×10^6 D vorhanden. Weiter zeigten SP R 2015 (Bahn 4) und Orf 60898 (Bahn 5) ein ähnliches Bild. Bei Orf Ch 32/H (Bahn 6) und SP Ch 14/B (Bahn 7) fanden sich identische Restriktionsmuster. Untereinander ähnlich, aber völlig verschieden zu den Vorherigen, waren die Restriktionsmuster von SP 1374 (Bahn 10), SP 1781 (Bahn 11), SP 69558 (Bahn 12), ebenso diejenigen von SP M 20/4 (Bahn 13), SP M 7/4 (Bahn 14) und SP 66/1456 (Bahn 15). Keinerlei Aehnlichkeit, weder untereinander noch mit den bereits beschriebenen Mustern, zeigten die Verdauungen der DNA von EP VR 634 (Bahn 18), EP P 4/4 (Bahn 19), EP 174/77 (Bahn 20), EP 70448 (Bahn 9) und SP 69559 (Bahn 8). Souche 2 (Bahn 16) und Orf XIVa (Bahn 17) wiederum wiesen eine gewisse Aehnlichkeit miteinander auf, waren aber

Legende zu Abb. 2

Je 10 mit Eco RI restringierte Parapoxvirus-DNA's wurden zusammen mit einem Marker-DNA auf ein Agaroseflachgel geladen, unter identischen Bedingungen (Spannung, Zeit) elektrophoretisch aufgetrennt, gefärbt und fotografiert. Die Bahnen auf den Photos wurden ausgeschnitten und nach der Aehnlichkeit der Restriktionsmuster zusammengestellt. Das gleiche Verfahren wurde für die Hind III und Bst E II-Restriktion verwendet (Abb. 3 und 4)

Marker-DNA (Bahn O): Hind III-Restriktionsfragmente von Rabbitpoxviurs, Stamm Utrecht (41).

Parapoxvirus-Stämme:

Bahn 1:	SP V 660	Bahn 11:	SP R 1781
" 2:	SP R 406	" 12:	SP 69558
" 3:	SP VR 801	" 13:	SP M 20/4
" 4:	SP R 2015	" 14:	SP M 7/4
" 5:	Orf 60898	" 15:	SP 60/1456
" 6:	Orf Ch 32/H	" 16:	Orf Souche 2
" 7:	SP Ch 14/B	" 17:	Orf XIVa
" 8:	SP 69559	" 18:	EP VR 634
" 9:	EP 70448	" 19:	EP P 4/4
" 10:	SP R 1374	" 20:	EP 174/77

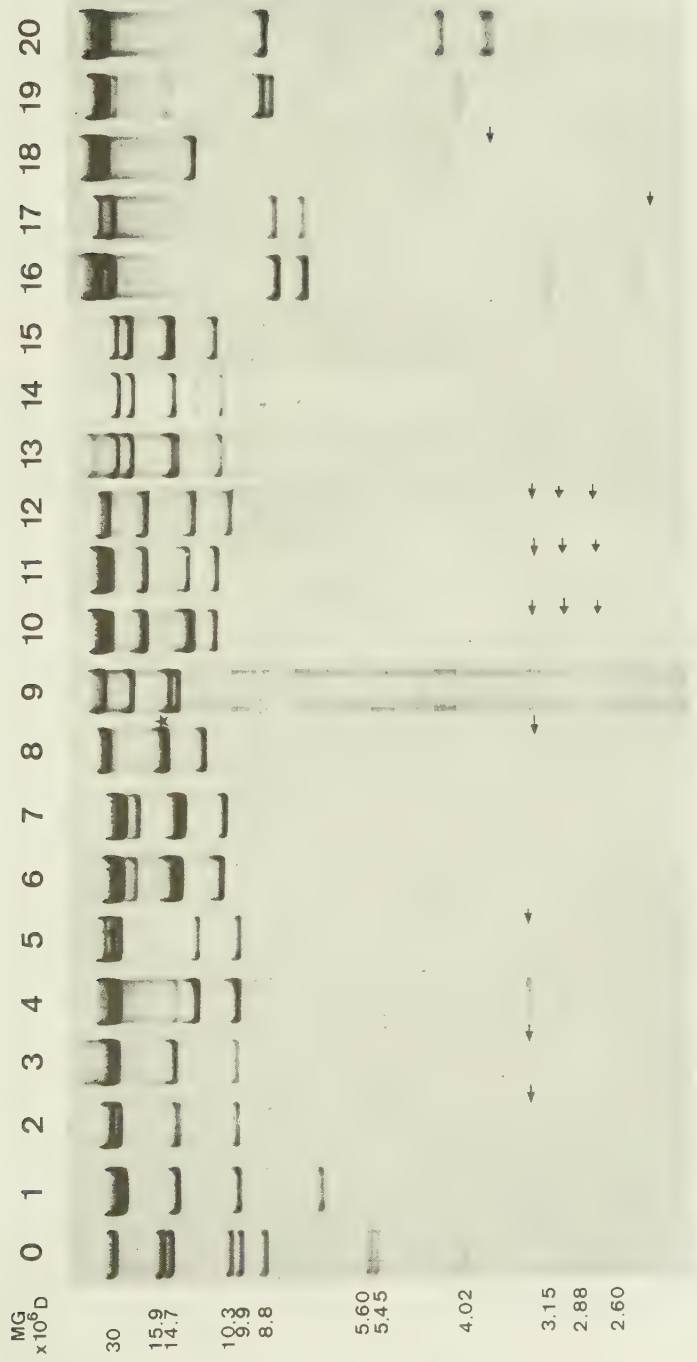


Abb. 2 Eco RI-Restriktionsmuster der DNA von 20 Parapoxvirus-Stämmen. Bahnverteilung: siehe Legende zu Abb. 2. Die schlecht sichtbaren Banden sind mit einem Pfeil, die Doppelbanden mit einem Stern markiert. (Elektrophorese: 16 1/4 h bei 35 V in 0.6 % Agarose)

nicht mit den anderen Stämmen vergleichbar.

4.1.2. Hind III-Restriktionsmuster (Abb. 3)

Hind III (Erkennungssequenz: A'AGCTT) schnitt die DNA in 4 - 11 Fragmente. Das MG des grössten Fragments betrug 64.5×10^6 D (SP R 1374/Bahn 10) und des kleinsten 2×10^6 D (EP P 4/4/Bahn 19). Die Restriktionsmuster von SP V 660 (Bahn 1), SP R 406 (Bahn 2) und SP VR 801 (Bahn 3) waren untereinander ähnlich, das gleiche gilt für die Stämme SP R 2015 (Bahn 4), Orf 60898 (Bahn 5), Orf Ch 32/H (Bahn 6), SP Ch 14/B (Bahn 7), SP 69559 (Bahn 8) und EP 70448 (Bahn 9). Bei all diesen Stämmen fanden sich Fragmente mit einem MG von ungefähr 18, 12 und 6.5×10^6 D. SP R 1374 (Bahn 10), SP R 1781 (Bahn 11), SP 69558 (Bahn 12) und M 20/4 (Bahn 13) sowie SP M 7/4 (Bahn 14) und SP 66/1456 (Bahn 15) waren untereinander ähnlich, unterschieden sich jedoch stark von den anderen Stämmen. Orf Souche 2 (Bahn 16), Orf XIVA (Bahn 17), EP VR 634 (Bahn 18), EP P 4/4 (Bahn 19) und EP 174/77 (Bahn 20) zeigten völlig verschiedene Restriktionsmuster, wobei sich keine Aehnlichkeiten zu anderen Stämmen ergaben.

4.1.3. Bst E II-Restriktionsmuster (Abb. 4)

Diese Endonuclease (Erkennungssequenz: G'GT-ACC) schnitt die DNA in mehr als 20 Fragmente, wobei die grössten ein MG von ungefähr 15×10^6 D hatten. Die Restriktionsmuster von SP V 660 (Bahn 1), SP R 406 (Bahn 2) und SP VR 801 (Bahn 3) zeigten gewisse Aehnlichkeiten. SP R 2015 (Bahn 4) und Orf 60898 (Bahn 5) wiesen sowohl Uebereinstimmung untereinander als auch mit den ersten drei Restriktionsmustern auf. Orf Ch 32/H (Bahn 6) und SP Ch 14/B (Bahn 7) zeigten identische Restriktionsmuster. Weiter sind die

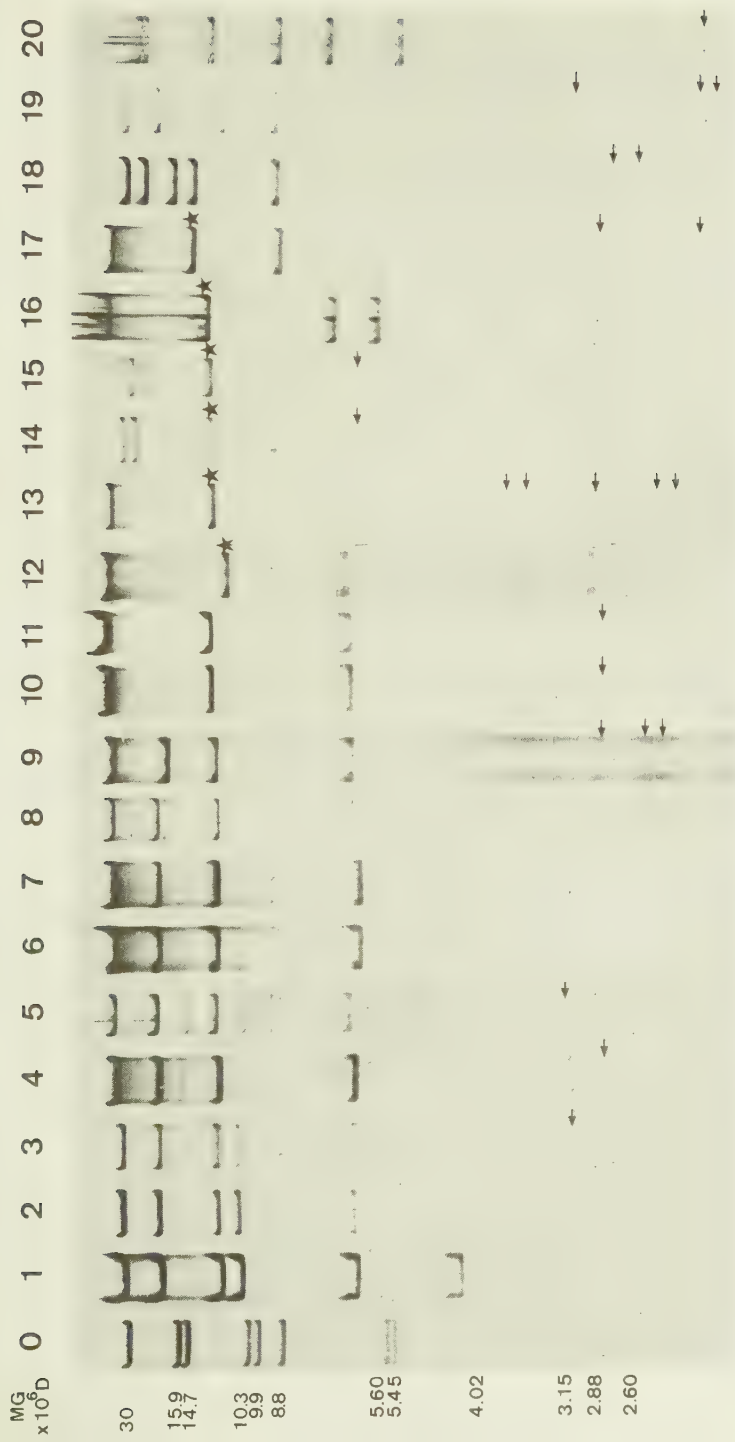


Abb. 3 Hind III-Restriktionsmuster. Die Bahnverteilung entspricht derjenigen in Abb. 2. Die schlecht sichtbaren Banden sind mit einem Pfeil, die Doppelbanden mit einem Stern markiert.
(Elektrophorese: 10 l/4 h bei 35 V in 0.6 % Agarose)

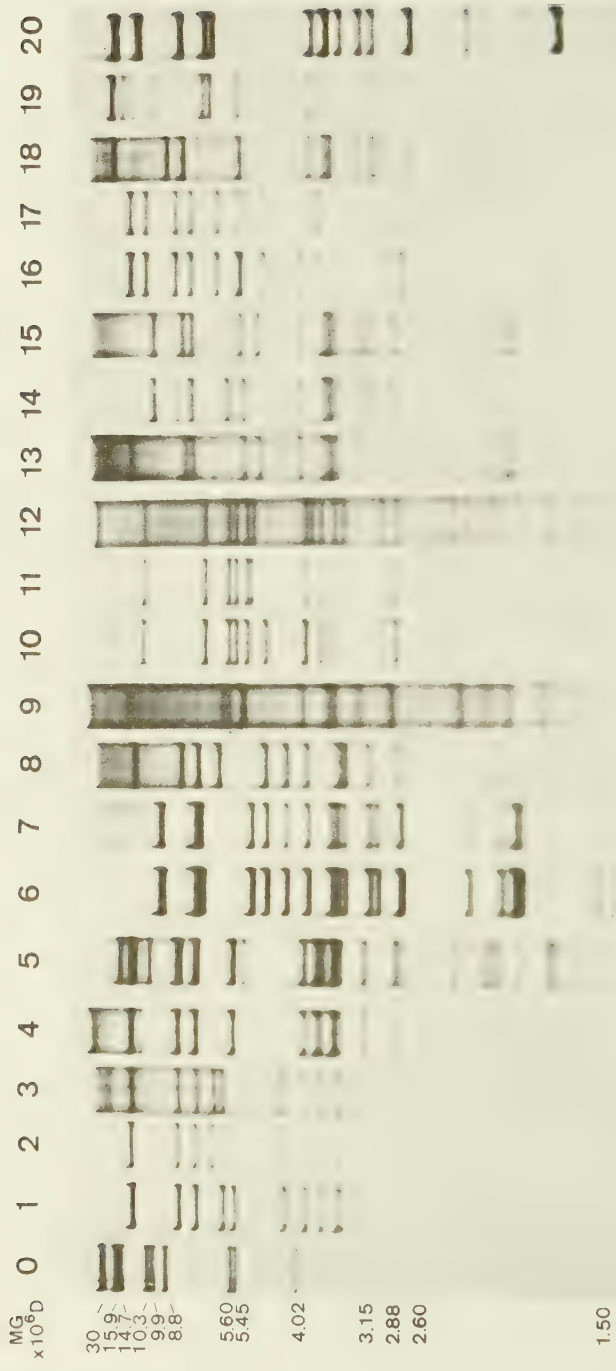


Abb. 4 Bst E II-Restriktionsmuster. Die Bahnverteilung entspricht derjenigen in Abb. 2 und 3.
(Elektrophorese: 15 h bei 30 V in 0.9 % Agarose)

Stämme SP R 1374 (Bahn 10), SP R 1781 (Bahn 11) und SP 69558 (Bahn 12) einander ähnlich, ebenso die Stämme SP M 20/4 (Bahn 13), SP M 7/4 (Bahn 14), EP 70448 (Bahn 9) und SP 66/1456 (Bahn 15). Der Stamm SP 69559 (Bahn 8) zeigte v.a. bei den mittelgrossen und kleinen Fragmenten ($< 2 \times 10^6$ D) eine gewisse Aehnlichkeit mit der SP-Orf Gruppe (1 - 5). Gute Uebereinstimmung der Muster bestand auch zwischen Orf Souche 2 (Bahn 16) und Orf XIVa (Bahn 17). Währenddem die Restriktionsmuster der Stämme EP VR 634 (Bahn 18), SP P.4/4 (Bahn 19) und EP 174/77 (Bahn 20) sich von denjenigen anderer Stämme völlig unterschieden. Sie zeigten auch untereinander keine Aehnlichkeit.

4.2. MG-Bestimmung durch Summation der MG der Fragmente nach Gelelektrophorese

Die MG der einzelnen Fragmente wurden mittels einer Eichkurve bestimmt, wobei Hind III verdaute Rabbitpox-DNA als Marker diente (41, 28, 6, 22). Durch Summation wurde das gesamte MG der DNA verschiedener Virusstämme errechnet. Die einzelnen Fragmente wurden in abnehmender Grösse alphabetisch geordnet. Die Ergebnisse sind in den Tabellen 2, 3 und 4 zusammengestellt.

Die Intensität der Fluoreszenz eines Fragmentes im Agarosegel ist direkt proportional zur DNA-Konzentration, folglich sollte die Intensität der Fluoreszenz mit kleiner werdendem MG der Fragmente abnehmen. War dies nicht der Fall, nahmen wir an, dass es sich um Doppelbanden handelte (in Abb. 2 und 3 mit einem Stern gekennzeichnet). Diese Annahmen wurden bestätigt durch den Vergleich der mit Hind III- und Eco RI-Fragmenten errechneten Total-MG. Dementsprechend wurden die MG dieser Fragmente doppelt (dreifach) gezählt. Es wurden folgende Extremwerte der Genommolekulargewichte von Para-

Tabelle 2

Molekulargewichte* der Eco RI-Restriktionsfragmente der DNA der Parapoxvirus-Stämme: MG $\times 10^6$ D.

Stamm Fragment	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
A	27.5	31	32	32	31	27.5	27.5	34	40	36	35	36	26.0	27.5	27.5	44	42	44	39	39
B	25	26.5	28	27	26.5	25.2	25.2	15.2	21.5	18.2	18.2	18.2	21.5	22	21.5	28	28.5	32	31	31
C	14	14	14.5	12.5	12.5	14.3	14.3	15.2	14.5	12.9	13.1	12.5	14.6	14.6	14.8	8.2	8.2	12.2	8.8	8.6
D	10	10	10	10	10	13.7	13.7	3.4	13.7	11.2	11	10.2	14.4	14.5	14.6	7.2	7.3	4.1	8.4	4.1
E	6.8	3.5	3.5	3.5	3.5	10.6	10.6			3.5	3.5	4.5	11	11	11.2	3.1	2.2	3.5	4.1	3.7
F	3.5									3.0	3.0	3.5				2.4				3.5
G										2.6	2.6	3.0								
H												2.6								
Total MG	86.8	85.0	88.0	85.0	83.5	91.3	91.3	95.0	89.7	87.4	86.4	90.5	87.5	89.6	89.6	92.9	88.2	95.8	91.3	89.9
Zahl der Fragmente	6	5	5	5	5	5	5	6	4	7	7	8	5	5	5	6	5	5	5	6

* Als Molekulargewichtsstandard diente RPV-DNA (Stamm Utrecht) mit Hind III verdaut.

* Molekulargewichte der Hind III-Restriktionsfragmente der DNA der Parapoxvirus-Stämme: MG x 10⁶ D.

Stamm Fragment	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
A	34	35.5	37	45	45	55	55	55	46.5	64.5	64.5	58	44	28	28	50	38	26.5	26.5	22
B	18	18	18	18	18	18	18	19	16.5	12.5	12.5	11.3	12.2	23.5	26	12.5	13.5	20	17.5	21
C	11.8	12	12	12	12	12	12	12	12	6.5	6.5	6.5	6.2	12.2	12.2	6.7	8.5	15	11.1	12.2
D	10.5	10.5	10.5	6.5	6.5	6.2	6.2	6.5	6.4	2.8	2.8	2.9	3.5	10.3	6	5.6	5.6	13.5	8.9	8.7
E	6.3	6.3	6.3	3.1	3.1			2.8					3.4	6		2.8	4.2	8.6	7	6.9
F	4.3	4.3	3.1	2.8				2.5					3			2	2.8	2.7	3.6	5.4
G								2.3					2.5				2	2.5	3.2	3.3
H													2.3						3.1	2.8
I																		3		2.6
K																		2.2	2.5	
L																		2	2.2	
Total MG	84.9	86.6	86.9	87.4	84.6	91.2	91.2	92.5	89.0	86.3	86.3	90.0	89.3	92.2	84.4	92.1	88.1	88.8	88.1	89.6
Zahl der Fragmente	6	6	6	6	5	4	4	4	7	4	4	5	9	6	5	7	8	7	11	11

* Erklärung: siehe Tabelle 2

Tabelle 4

Molekulargewichte der Genome der 20 untersuchten
Parapoxvirus-Stämme

Das Total-MG des Genomes der Parapoxvirusstämme wurde
durch Summation der MG der einzelnen Fragmente bestimmt.

Nr.	Stamm	Molekulargewichte des ganzen Genoms x10 ⁶	
		Hind III	Eco RI
1	SP V 660	84.9	86.8
2	SP R 406	86.6	85.0
3	SP VR 801	86.9	88.0
4	SP R 2015	87.4	85.0
5	Orf 60898	84.6	83.5
6	Orf Ch 32/H	91.2	91.3
7	SP Ch 14/B	91.2	91.3
8	SP 69559	92.5	95.0
9	EP 70448	89.0	89.7
10	SP R 1374	86.3	87.4
11	SP R 1781	86.3	86.4
12	SP 69558	90.0	90.5
13	SP M 20/4	89.3	87.5
14	SP M 7/4	92.2	89.6
15	SP 66/1456	84.4	89.6
16	Orf Souche 2	92.1	92.9
17	Orf XIVa	88.1	88.2
18	EP VR 634	88.8	95.8
19	EP P 4/4	88.1	91.3
20	EP 174/77	89.6	89.9
Durchschnittl. MG des Genoms der Parapoxviren		$\bar{x} = 88.5 \quad s=2.55$	$\bar{x} = 89.2 \quad s=3.2$
		89	

poxvirus-Stämmen festgestellt: 83.5×10^6 D (Orf 60898/Bahn 5 mit Eco RI verdaut) und 95.8×10^6 D (EP VR 634/Bahn 18 mit Eco RI verdaut), ein Unterschied von ca. 13% bezogen auf das höhere molekulare Genom. Das durchschnittliche MG der Parapoxvirus-DNA betrug nach unseren Berechnungen 89×10^6 D.

4.3. MG-Bestimmung durch DNA-Längenmessung im Elektronen- Mikroskop

Es wurden 3 Parapoxvirus-Stämme untersucht: SP V 660, Orf 60898 und EP VR 634.

Da man bei der elektronenoptischen Betrachtung der DNA-Moleküle (Abb. 5) nicht feststellen konnte, ob die DNA-Stränge ihre volle Länge aufwiesen, wurden nur die längsten Moleküle ausgewertet. Es waren dies bei SP V 660 und EP VR 634 30 Moleküle sowie bei Orf 60898 13 Moleküle. Anhand der Länge und dem MG eines Basenpaares wurde jeweils das Total-MG eines DNA-Moleküls errechnet (Tab. 5). Wie aus Tabelle 6 zu ersehen ist, bestand eine gute Uebereinstimmung der elektronenoptisch- und elektrophoretisch errechneten Werte.



Abb. 5 Elektronenmikroskopische Aufnahme eines gespreiteten Parapoxvirus-DNA-Moleküls (Stamm V 660). Anfang und Ende des Doppelstranges sind durch Pfeile markiert. Die zirkuläre Form der PM₂-DNA diente als Marker.

Tabelle 5

MG-Bestimmung des Genoms dreier Parapoxvirusstämme durch
Messung der Moleküllänge im Elektronenmikroskop

	SP V 660		EP VR 634		Orf 60898	
Molekül	Länge μm	MG x 10^6 D	Länge μm	MG x 10^6 D	Länge μm	MG x 10^6 D
1	46.5	90.2	51.8	100.6	43.4	84.2
2	45.0	87.4	50.8	98.6	43.0	83.5
3	48.3	93.7	51.1	99.2	43.3	84.1
4	46.2	89.8	50.5	98.0	42.2	81.9
5	42.6	82.6	51.6	100.2	42.6	82.7
6	45.5	88.4	49.3	95.7	42.4	82.3
7	44.6	86.6	49.5	96.1	43.4	84.2
8	45.4	88.2	48.4	94.0	44.4	86.2
9	47.3	91.9	47.5	92.2	42.6	82.7
10	44.3	86.0	48.6	94.3	42.2	81.9
11	44.7	86.8	47.0	91.2	42.6	82.7
12	43.2	83.9	51.1	99.2	43.0	83.5
13	42.9	83.2	50.7	98.4	42.8	83.1
14	43.5	84.5	50.9	98.8		
15	47.3	91.9	48.3	93.8		
16	46.1	89.5	51.3	99.6		
17	46.9	91.0	46.9	91.1		
18	47.0	91.1	48.8	94.7		
19	42.6	82.6	49.1	95.3		
20	46.5	90.2	46.9	91.0		
21	47.7	92.5	47.7	92.6		
22	48.5	94.2	47.6	92.4		
23	43.7	84.7	51.5	100.0		
24	42.9	83.2	48.7	94.5		
25	43.4	84.2	48.3	93.8		
26	43.5	84.5	49.3	95.7		
27	42.5	82.5	50.1	97.3		
28	42.4	82.2	46.9	91.0		
29	42.7	83.0	47.1	91.4		
30	45.8	88.9	47.6	92.4		
Mittelwert	45.0	87.3	49.0	95.4	42.9	83.3

Tabelle 6

Vergleich zweier Molekulargewichts-Bestimmungsmethoden

MG-Bestimmung des Genomes von Parapoxviren durch elektronenoptische Längenmessung der DNA-Moleküle und durch Vergleich mit Marker-DNA-Fragmenten im Agarosegel nach Verdauung mit Hind III und Eco RI Endonukleasen ($MG \times 10^6 D$).

Virus-Stamm	MG-Bestimmungs- methode	elektronenoptisch	elektrophoretisch
SP V 660		87.3	85.9
EP VR 634		95.4	92.4
Orf 60898		83.3.	84.1

5. DISKUSSION

Wittek et al. (43) haben anhand der Restriktionsmuster 5 SP- und 3 Orf-Virusstämme untersucht und dabei eine Einteilung der SP-Virusstämme in zwei Gruppen und der Orf-Virusstämme in eine, allerdings in sich heterogene, Gruppe vorgenommen.

Anhand der vorliegenden Restriktionsanalyse weiterer 19 untersuchter Virusstämme (12 SP, 4 Orf und 4 EP) ergibt sich eine vorläufige Klassierung in acht Gruppen (Tab. 7). Die Ergebnisse beider Untersuchungen lassen sich vergleichen:

Die von Wittek et al. beschriebenen zwei Gruppen von SP-Viren konnten wir dank der Untersuchung einer grösseren Zahl von Stämmen um eine weitere ergänzen.

Was die Orf-Stämme anbelangt, sind wir zu gleichen Schlussfolgerungen durch die Prüfung von 4 zusätzlichen Stämmen gekommen:

1. Die Orf-Viren lassen sich von SP-Viren in bezug auf Restriktionsmuster eindeutig abtrennen.
2. Die Gruppe der Orf-Viren ist in sich nicht homogen, sondern es lassen sich 2 Gruppen unterscheiden.

Wittek et al. haben keine EP-Stämme untersucht. Wir haben die Virusstämme EP VR 634 (Bahn 18), EP P 4/4 (Bahn 19) und EP 174/77 (Bahn 20) in 3 Gruppen gegliedert, weil sie 1. untereinander völlig verschieden sind und weil 2. ein zusätzlich untersuchter Virusstamm (EP P 2/4) ein dem Stamm EP P 4/4 ähnliches Restriktionsmuster liefert und somit mit diesem in eine Gruppe gehört.

Tabelle 7

Klassifizierung der 20 untersuchten Poxvirusstämme
(12 SP-, 4 Orf- 4 EP-Stämme) anhand der DNA-Restriktions-
muster

(Familie):	(Poxviridae)
(Subfamilie):	(Chordopoxvirinae)
(Genus):	Parapoxvirus
(Subgenus):	Parapoxvirus A: SP V 660 (Bahn 1), SP R 406 (Bahn 2), SP R 2015 (Bahn 4), SP VR 801 (Bahn 3), Orf 60898 (Bahn 5), SP 69559 (Bahn 8)
	" B: SP R 1374 (Bahn 10), SP 1781 (Bahn 11), SP 69558 (Bahn 12)
	" C: SP M 20/4 (Bahn 13), SP M 7/4 (Bahn 14), SP 66/1456 (Bahn 15), EP 70448 (Bahn 9)
	" D: Orf Souche 2 (Bahn 16), Orf XIVa (Bahn 17)
	" E: Orf Ch 32/H (Bahn 6), SP Ch 14/B (Bahn 7)
	" F: EP VR 634 (Bahn 18)
	" G: EP P 4/4 (Bahn 19) (EP P 2/4 nicht in Abb. 2,3,4 berücksichtigt)
	Parapoxvirus H: EP 174/77 (Bahn 20)

Ueberschneidungen ergaben sich in den SP-Gruppen, in denen sich ein Orf- und ein EP-Stamm finden und in den Orf-Gruppen, in denen ein SP-Stamm zu finden ist. So passen in das vorgelegte Schema (Tab. 7) die Stämme Orf 60898, EP 70448 und SP Ch 14/B nicht hinein. Für eine Erklärung der Schwierigkeiten bei der Klassifizierung dieser Gruppe von Viren kann man sich nur auf Vermutungen stützen. Es ist bekannt, dass SP-Viren auf Schafe, und umgekehrt, dass Orf-Viren auf Rinder übertragen werden können. Es ist also durchaus möglich, dass z.B. ein bei einem Schaf isoliertes Parapoxvirus, das klinisch gesehen Lippengrind verursacht, ursprünglich ein SP-Virus war; denn meist ist bei einem auf einer bestimmten Tierart isolierten Virusstamm die Infektionsquelle nicht mehr auszumachen.

Es wurde weiter versucht, zusätzliche Parameter zur Klassifizierung der Parapoxvirusstämme heranzuziehen. So kann mit Hilfe der Summation der Molekulargewichte der einzelnen Fragmente das Molekulargewicht des Virus-Genoms errechnet werden. Wie in Tab. 4 dargestellt, betrug das MG für die SP-DNA $88.5 \times 10^6 D$, für Orf-DNA $88.9 \times 10^6 D$ und für EP-DNA $91.6 \times 10^6 D$. Diese Zahlen erlauben wohl die Zuordnung zum Genus Parapoxvirus, im Gegensatz etwa zu den Orthopoxviren ($120 - 150 \times 10^6 D$). Eine Aufgliederung innerhalb des Genus ist aber nicht möglich.

Auch die Anzahl der Fragmente, die bei der Verdauung der DNA mit Restriktionsenzymen entstehen, lässt keine Klassifizierung innerhalb der Parapoxviren zu.

Auf den ersten Blick scheinen die vorliegenden Ergebnisse der Restriktionsanalyse im Widerspruch zu stehen mit dem Schluss, den Liebermann (19, 20) aus vergleichenden fluoreszenzserologischen Untersuchungen zog. Er fand, dass die Viren der SP, des Orfs, der EP und des MK serologisch

untereinander eng verwandt seien. Den analogen Fall trifft man aber auch bei Orthopoxviren an. Die Viren der Gruppe Variola, Vaccinia, Ektromelie sind serologisch sehr eng miteinander verwandt, so gelingt es z.B. nicht mit einfachen serologischen Methoden, Variola und Vaccinia auseinander zu halten. Mit Hilfe der Restriktionsanalyse lassen sich aber diese Viren differenzieren. Es ist deshalb anzunehmen, dass auch Parapoxviren wie Orthopoxviren gemeinsame Antigene besitzen. Bei gezielter Adsorption der Seren wäre es durchaus möglich, dass gruppenspezifische Antigene zu finden wären, die eine weitere Differenzierung der Stämme gestatteten. Auch monoklonale Antikörper könnten zur Klassifizierung herangezogen werden.

Bei den Orthopoxviren erscheinen bei der Restriktion von DNA verschiedener Stämme Fragmente mit gleichem Molekulargewicht, sodass bei einiger Erfahrung schon auf den ersten Blick erkannt werden kann, dass es sich um ein Orthopoxvirus handelt. Es hat sich herausgestellt, dass bei der Erstellung der Restriktionskarte eine konservative Region im Mittelteil des Genoms aller bisher untersuchten Orthopoxvirusstämme nachweisbar ist, die bis zu einem gewissen Grade orthopoxviruspezifisch ist.

Auch bei den Parapoxviren lässt sich das Vorhandensein einer solchen Region vermuten. So erscheinen bei Hind III-Restriktionen bei einer Mehrzahl der Stämme Fragmente mit einem Molekulargewicht von $\sim 12 \times 10^6$ D. Das A-Fragment weist bei der Hind III-Restriktion ein Molekulargewicht von $\sim 22 \times 10^6$ D oder mehr auf und bei Verdauung mit Eco RI $\sim 26 \times 10^6$ D oder mehr. Dies würde übereinstimmen mit der von Liebermann nachgewiesenen serologisch engen Verwandtschaft der Parapoxviren und wäre zu vergleichen mit den Befunden, wie sie bei Orthopoxviren erhoben wurden. Andererseits haben wir keine Anhaltspunkte, dass, wie bei den Orthopoxviren, auch bei den Parapoxviren die Unterschiede

im Restriktionsmuster zwischen verschiedenen Virusstämmen stets in den terminalen Regionen des Genoms lokalisiert sind. Darüber Aufschluss kann aber nur die Restriktionskarte geben, zu deren Erstellung die Erkennungssequenzen verschiedener Restriktionsenzyme auf dem Genom lokalisiert werden.

Wittek et al. haben festgestellt, dass der Orfstamm D 1701, der über 137 Passagen in Lämmernieren-Zellkulturen geführt wurde, verglichen mit dem Virusmaterial aus der 8. Passage, einige Veränderungen im Restriktionsmuster aufwies, obschon sich das Muster im Prinzip ähnlich blieb. Es kann deshalb nicht ausgeschlossen werden, dass Passagen in einer anderen Tierart, z.B. bei der Uebertragung von Schaf zu Rind, eine tiefer greifende Veränderung der Restriktionsmuster zur Folge haben. Die Heterogenität der Muster verschiedener SP-Virusstämme könnte in diesem Falle die verschiedenen Grade der Adaptation des Virus an den Wirt (in unserem Falle das Kalb) widerspiegeln, wobei man sich eine Primärinfektion sowohl mit Orf- wie mit EP-Viren vorstellen könnte.

Erstaunlicherweise liegt die Heterogenität der Parapoxvirusstämme nicht in ihrer verschiedenen geographischen Herkunft begründet. So war der Stamm SP M 7/4 (Bahn 14) aus Berlin eng verwandt mit Stamm SP 66/1456 (Bahn 15) aus Perugia. Ebenso enge Verwandtschaft zeigte sich auch zwischen Stämmen, die in Bern, in München oder in den U.S.A. isoliert wurden, oder zwischen Stämmen aus Lyon und Düsseldorf. Entweder scheint keine grosse Typenvariabilität bei den Parapoxviren vorzuherrschen oder es wurden Stämme durch den Tierhandel über weite Strecken verschleppt.

In unserem Material standen uns vor allem SP-Virusstämme zur Verfügung. Das hat wahrscheinlich etwas zu tun mit den zur Vermehrung der Viren verwendeten Zellen. Um den Einfluss des Zellkultursystems auf die Restriktionsmuster

auszuschalten (43), wurde mit bovinen Nasenmuschelzellen gearbeitet. Gewisse Orf- und EP-Stämme liessen sich nur schwer in diesen Zellen vermehren, so musste Stamm EP 174/77 über 15 Blindpassagen geführt werden bis ein deutlicher ZPE auftrat. Es hat sich später gezeigt, dass Hautzellen von Schafembryonen für die Replikation von Orf- und EP-Viren geeigneter sind und dass sich nur SP-Stämme in den ursprünglichen Wirtszellen problemlos vermehren liessen. Es muss deshalb noch abgeklärt werden, welchen Einfluss die Vermehrung in Schafzellen im Vergleich zu Rinderzellen auf das Restriktionsmuster hat.

Die DNA's verschiedener Virusstämme waren mit üblichen Enzymkonzentrationen (3 Einheiten für 300 ng Virus-DNA) nicht restringierbar. Die Ursache für diesen refraktären Zustand ist unbekannt. Mit einer um Faktor 10 erhöhten Enzymkonzentration liessen sich die DNA's einiger Virusstämme restringieren. Die DNA anderer Stämme war aber auch unter diesen Umständen nur partiell zu verdauen, und so konnten diese Stämme nicht in die Untersuchung einbezogen werden.

Prinzipiell könnte man sich anhand der vorliegenden Daten fragen, ob die Einordnung der Parapoxviren als Genus in die Familie der Poxviridae in Anbetracht der neuen Erkenntnisse noch aufrecht zu erhalten ist, oder ob nicht viel mehr eine Familie der Parapoxviridae zu kreieren sei.

Ein anderes Problem stellt die Einteilung innerhalb der Parapoxviren dar: Hat man es bei den postulierten Gruppen mit Genera, Subgenera, Gruppen oder Typen zu tun?

Die hier aufgeworfenen Fragen lassen sich nur durch eine zusätzliche Untersuchung weiterer (besonders Orf- und EP) Stämme mittels der Restriktionsanalyse beantworten. Ergänzend wären noch "Physical maps" je eines Vertreters der 8 postulierten Gruppen zu erstellen.

6. ZUSAMMENFASSUNG

12 Stomatitis papulosa-, 4 Orf- und 4 Euterpocken-Virusstämme wurden anhand der DNA-Restriktionsmuster miteinander verglichen. Mit Hilfe der Restriktionsanalyse lassen sich die untersuchten Parapoxvirusstämme in 3 SP- 2 Orf- und 3 EP-Gruppen gliedern. Innerhalb der Gruppen besteht eine enge genetische Verwandtschaft. Die Gruppen untereinander sind jedoch sehr heterogen.

7. LITERATURVERZEICHNIS

1. Archard, L.C. and Mackett, M.: Restriction endonuclease analysis of red cowpox virus and its white pock variant. *J. Gen. Virol.*, 45, 51-63 (1979).
2. Aynaud: La stomatite pustuleuse contagieuse des ovins. *Ann. Inst. Pasteur*, 37, 498-527 (1923).
3. Castrucci, G., McKercher, D.G., Cilli, V., Arancia, G. and Nazionali, C.: Characteristics of a Paravaccinia Virus from cattle. *Arch. ges. Virusf.*, 29, 315-330 (1970).
4. Davis, R.M., Simon, M. and Davidson, N: Electron microscope heteroduplex methods for mapping of base sequence homology in nucleic acids. *Methods in Enzymology*, 21, 413-428 (1971) Academic Press, New York
5. Dunant, Ph., Perroud, P. et Steck, F.: Stomatite papuleuse des bovins. *Schweiz. Arch. Tierheilk.*, 117, 503-515 (1975).
6. Esposito, J.J., Obijeski, J.F. and Nakano, J.H.: Orthopox-virus DNA: Strain differentiation by electrophoresis of restriction endonuclease fragmented virion DNA. *Virology*, 89, 53-66 (1978).
7. Fenner, F.: The classification and nomenclature of viruses. Summary of results of meetings of the International Comitee on Taxonomy of Viruses in Madrid, September 1975. *J. Gen. Virology*, 31, 463-470 (1976).

8. Gafford, L.G. and Randall, C.C.: The high molecular weight of the fowlpox virus genome.
J. Molecular Biology, 26, 303-310 (1967).
9. Gangemi, J.D. and Sharp, D.G.: Use of a restriction endonuclease in analyzing the genomes from two different strains of vaccinia virus.
J. of Virol., 20, 319-323 (1976).
10. Glover, R.E.: Contagious pustular dermatitis. A. Cross immunity experiments with various strains. B. Serological tests.
Rep. Inst. Anim. Pathol., Cambr., 3, 1-13 (1933).
11. Goldschmit, L. and Barzilai, E.: Propagation of bovine viral diarrhoe viruses in bovine fetal lung cultures.
Am. J. vet. Res., 36, 407-412 (1975).
12. Horgan, E.S. and Haseeb, M.A.: The immunological relationships of strains of contagious pustular dermatitis.
J. Comp. Pathol., 57, 1-7 (1957).
13. Huck, R.A.: A Paravaccinia Virus isolated from Cow's Teat's.
Vet. Rec., 78, 503-505 (1966).
14. Joklik, W.K.: The purification of four strains of poxvirus.
Virology, 18, 9-18 (1962).
15. Kleinschmidt, A.K. and Zahn, R.K.: Darstellung molekularer Fäden von DNS.
Z.f. Naturforsch., B 14, 770 (1959).

16. Kleinschmidt, A.K.: Monolayer techniques in electron microscopy of nucleic acid molecules.
Methods in Enzymology, 12, 361-377 (1968) Academic Press, New York.
17. Lauder, J.M., Martin, B., Martin, W.B., Nagington, J.:
Milker's Nodule Virus Infection and its Resemblance to Orf.
Vet. Rec., 78, 926 (1966).
18. Liebermann, H.: Beziehungen zwischen Melkerknoten, Euterpocken, Stomatitis papulosa und Ecthyma contagiosum.
Zschr. ärztl. Fortbild., 61, 447-448 (1967).
19. Liebermann, H.: Serolog. Beziehungen zwischen Paravaccinaviren.
Arch. exp. Vet. Med., 20, 1351-1354 (1966).
20. Liebermann, H.: Vergl. immunhistol. Studien an mit Paravakzineviren infizierten Zellkulturen.
Arch. exp. Vet. Med., 21, 1379-1389 (1967).
21. Loehning, U.E.: The determination of the molecular weight of ribonucleic acid by polyacrylamide-gel electrophoresis.
Biochem. J., 113, 131-138 (1969).
22. Mackett, M. and Archard, L.C.: Conservation and Variation in Orthopoxvirus Genome Structure.
J. Gen. Virol., 45, 683-701 (1979).
23. Matthews, R.E.F.: Classification and Nomenclature of viruses.
Intervirology, 12, 129-296 (1979).

24. Mayr, A., Bachmann, P.A., Bibrack, B. and Wittmann, G.:
Virologische Arbeitsmethoden, Bd. 1: Zellkulturen, Bebrütete
Hühnereier, Versuchstiere (VEB Gustav Fischer Verlag, Jena
1974).
25. Mc Bride, W.D.: Antigenic Analysis of polioviruses by
kinetic studies of serum neutralization.
Virology, 7, 45-58 (1959).
26. Mc Carbon, R.J., Cabrera, C.V., Esteban, M., Mc Allister,
W.J. and Holowczak, J.A.: Structure of vaccinia DNA: ana-
lysis of the viral genome by restriction endonucleases.
Virology, 86, 88-101 (1978).
27. Menna, A., Wittek, R., Bachmann, P.A., Mayr, A. and Wyler,
R.: Physical characterization of a stomatitis papulosa
virus genome: A cleavage map for the restriction endonu-
cleases Hind III and Eco RI.
Arch. Virol., 59, 145-156 (1979).
28. Müller, H.K., Wittek, R., Schaffner, W., Schümperli, D.,
Menna, A. and Wyler, R.: Comparison of five poxvirus ge-
nomes by analysis with restriction endonucleases Hind III,
Bam I and Eco RI.
J. gen. Virol., 38, 135-147 (1977).
29. Nagington, J., Lauder, J.M. and Smith, J.S.: Bovine papular
stomatitis, pseudocowpox and milker's nodules.
Vet. Rec., 81, 307-313 (1967).
30. Nagington, J.: The growth of paravaccinia viruses in tissue
culture.
Vet. Rec., 82, 477-482 (1968).

31. Nagington, J., Plowright, W. and Horne, R.W.: The morphology of bovine papular stomatitis virus.
Virology, 17, 361-364 (1962).
32. Nagington, J., Tee, G.H., Smith, J.S.: Milker's Nodule Virus Infection in Dorset and their Similarity to Orf.
Vet. Rec., 78, 305-308 (1966).
33. Nasemann, Th.: Die Viruskrankheiten der Haut.
In: Handbuch der Haut und Geschlechtskrankheiten von J. Jadassohn, Bd. IV/2, Springer, Berlin (1961).
34. Plowright, W. and Ferris, R.D.: Papular Stomatitis of Cattle in Kenya and Nigeria.
Vet. Rec., 71, 718-723 (1959).
35. Plowright, W., Witcomb, M.A. and Ferris, R.D.: Studies with a strain of contagious pustular dermatitis virus in tissue culture.
Arch. ges. Virusforsch., 9, 214-231 (1960).
36. Pospischil, A. and Bachmann, P.A.: Nuclear Changes in Cells Infected with Parapoxviruses Stomatitis Papulosa and Orf: an in vivo and in vitro Ultrastructural Study.
J. gen. Virol., 47, 113-121 (1980).
37. Schmidt, D.: Die Dermatitis pustulosa der Schafe. In: Röhrer, Handbuch der Viruskrankheiten der Tiere, Vol 2, pp. 713-763 (Gustav Fischer Verlag, Jena 1967).
38. Schümperli, D., Lagadec, R. and Müller, H.K.: DNA sequence homology estimation by combinatorial analysis of endonuclease restriction data.
J. gen. Virol., 38, 161-166 (1978).

39. Shawney, A.N.: Studies on the virus of contagious ecthyma. III. Multiplicity of virus strains. Izv. mikrobiol. Institut, Sofia, 18, 163-189 (1966).
40. Wittek, R., Müller, H.K., Menna, A. and Wyler, R.: Length heterogeneity in the DNA of vaccinia virus is eliminated on cloning the virus. FEBS Lett., 90, 41-46 (1978).
41. Wittek, R., Menna, A., Schümperli, D., Stoffel, S., Müller, H.K. and Wyler, R.: Hind III and Sst I restriction sites mapped on rabbit poxvirus and vaccinia virus DNA. J. Virol., 23, 669-678 (1977).
42. Wittek, R., Kuenzle, C.C. and Wyler, R.: High C+G content in Parapoxvirus DNA. J. Gen. Virol., 43, 231-234 (1979).
43. Wittek, R., Herlyn, M., Schümperli, D., Bachmann, P.A., Mayr, A. and Wyler, R.: Genetic and Antigenic Heterogeneity of Different Parapoxvirus Strains. Intervirology, 13, 33-41 (1980).

VERDANKUNGEN

Allen, die am Zustandekommen dieser Arbeit mitgeholfen haben, möchte ich herzlich danken.

Besonders danken möchte ich:

Herrn Prof. Dr. R. Wyler für die Ueberlassung des Themas und die Betreuung der Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. A. Mayr (München) für das Korreferat.

Herrn Dr. E. Meyer, Institut für Zoologie der Universität Zürich für die Benützung des MOP AMO 2 (Manual Optical Picture Analyzer).

Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. A. Mayr, Herrn Prof. Dr. F. Steck (Bern), Herrn Dr. C. Castrucci (Perugia), Herrn Dr. P.R. Rondhuis (Rotterdam), Herrn Prof. Dr. G. Kubin (Wien), Herrn Dr. J. Pilaski (Düsseldorf), Herrn Dr. A. Metzler (Zürich) und den Firmen: Veterinaria AG, Zürich und Mérieux, Lyon für die zur Verfügung gestellten Parapox-virus-Stämme.

Frl. E. Loepfe für die ausgezeichnete technische Mitarbeit.

Frau D. Bitterli für die elektronenmikroskopischen Arbeiten.

Herrn F. Schwendimann und Frau D. Bitterli für die Photographien.

Frl. Ch. Gerber für die Reinschrift des Manuskriptes.

Allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des virologischen Institutes für das beispielhafte Arbeitsklima.

LEBENS LAUF

Raymann Kurt, geboren am 27. Juni 1952 in Wattwil, SG

1959 - 1966	Besuch der Primarschule in Gebertingen, SG
1966 - 1973	Gymnasium Mariannhiller in Altdorf, UR
1973 - 1974	Medizinstudium bis zum 1. Propedeutikum an der Universität Fribourg
1974 - 1978	Studium der Veterinärmedizin an der Universität Zürich
Seit April 1979	Assistent am Institut für Virologie der Universität Zürich

